

EFFECTO DE MELATONINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN CITOSOL Y MITOCONDRIAS HEPÁTICAS DE RATONES $ROR\alpha^{-/-}$ SOMETIDOS A SEPSIS.

Natalia S. Fagali¹, Huayqui Volt², Carolina Doerrier², Roberto Vergano², Darío Acuña-Castroviejo²

¹INIFTA, CCT La Plata - CONICET, Dpto. de Química, Facultad de Cs. Exactas, UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

²CIBM, UGR, Granada, España.

nfagali@inifta.unlp.edu.ar

Introducción.

La sepsis es una respuesta inflamatoria masiva frente a la infección, caracterizada por estrés oxidativo, producción de citoquinas y disfunción mitocondrial, lo que puede inducir fallo multiorgánico y eventualmente, derivar en la muerte [1]. La administración de melatonina (MLT) ha demostrado tener efectos antioxidantes y antiinflamatorios y mejorar la supervivencia de animales sometidos a sepsis [2]. Se sabe que además de actuar en forma directa, MLT puede ejercer sus acciones antioxidantes a través de receptores.

Objetivo.

Evaluar el efecto de MLT sobre el estrés oxidativo en mitocondrias y citosol hepáticos de ratones *knock out* para el gen $ROR\alpha$ (codifica la proteína $ROR\alpha$ que representa un receptor nuclear para MLT) sometidos a sepsis.

Materiales y métodos.

Se emplearon 4 grupos de ratones: WT (*wild type*), CROR (Control ROR, ratones mutantes que no se sometieron a sepsis), S8H (ratones mutantes sacrificados tras 8h de inducida la sepsis) y S+M (ratones mutantes tratados con MLT y sacrificados tras 8h de inducida la sepsis). La sepsis se indujo por ligadura y punción cecal (CLP). Tras el sacrificio se extrajo el hígado y se separaron las fracciones subcelulares (mitocondrias y citosol) por ultracentrifugación diferencial. Se cuantificó glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) y se determinó la actividad de Glutatión peroxidasa (GPx) y Glutatión reductasa (GRd).

Resultados.

Contenido de glutatión en citosol y mitocondrias

En la Fig. 1, panel izq., se observa una disminución significativa del contenido de GSH en citosol en los animales que fueron sometidos a sepsis (S8H) con respecto a los grupos CROR y WT, situación que no fue contrarrestada por MLT. En mitocondrias (Fig. 1, panel der.) también se observa una caída significativa en el contenido de GSH con respecto a CROR y WT, aunque en esta organela la presencia de MLT (S+M) revirtió esta situación.

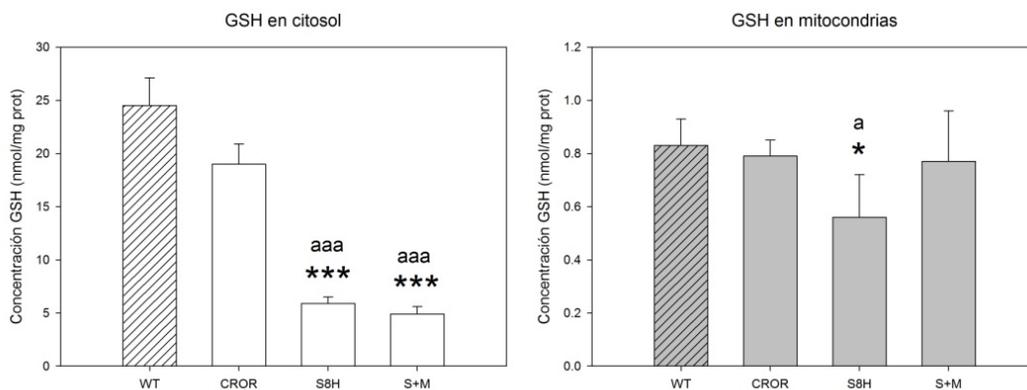


Figura 1. Contenido de GSH en citosol y mitocondrias hepáticos. Los valores expresan la media (\bar{x}) + el error estándar de la media (SEM). Diferencias estadísticas con respecto al grupo **WT** se indican con el símbolo **a**: $p < 0.05$, **aaa**: $p < 0.001$. Diferencias estadísticas con el grupo **CROR** se indican con el símbolo *****: $p < 0.05$, *******: $p < 0.001$ (ANOVA, Test de Tukey).

La relación GSSG/GSH en citosol (Fig. 2, panel izq.) se encontró aumentada en los grupos S8H y S+M, por lo que no se observó un efecto protector por parte de MLT. En mitocondrias (Fig 2, panel der.), en cambio, la relación GSSG/GSH no varió significativamente entre los grupos.

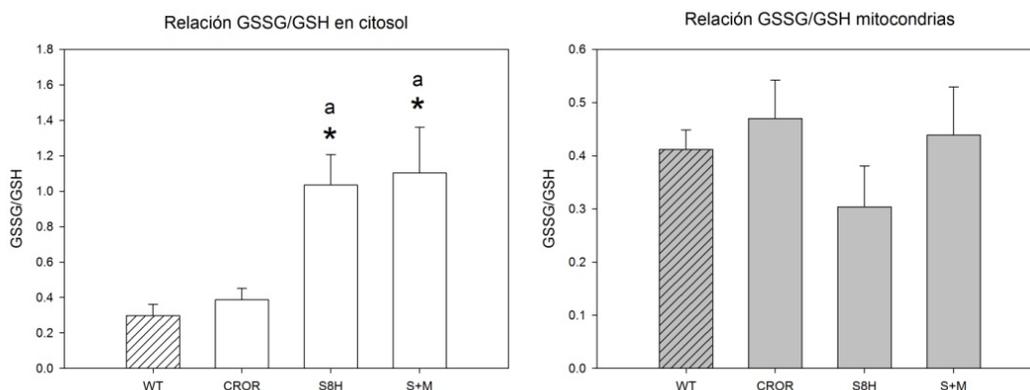


Figura 2. Relación GSSG/GSH en citosol y mitocondrias. Los valores expresan \bar{x} + SEM. Diferencias estadísticas con respecto al grupo **WT** se indican con el símbolo **a**: $p < 0.05$. Diferencias estadísticas con el grupo **CROR** se indican con el símbolo *****: $p < 0.05$ (ANOVA, Test de Tukey).

Actividad de GPx en citosol y mitocondrias

Según la Fig. 3 no se observaron variaciones significativas entre los distintos grupos con respecto a CROR en la actividad de GPx, en citosol ni en mitocondrias. En mitocondrias, el grupo S+M presentó diferencias significativas sólo con respecto al grupo WT.

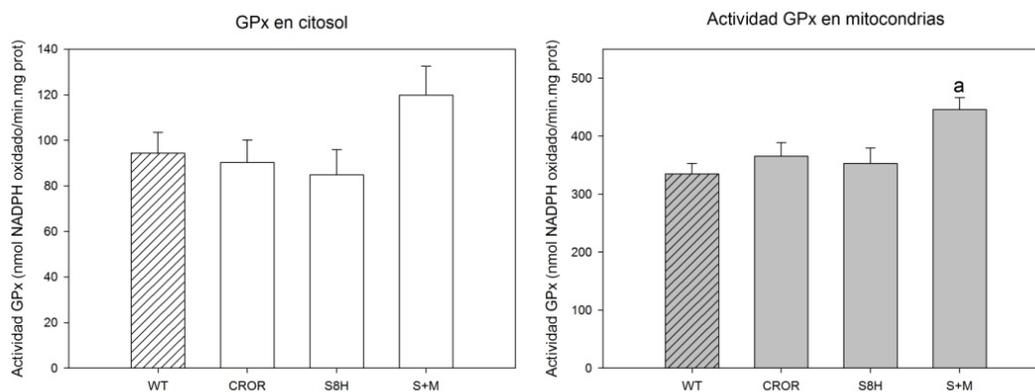


Figura 3. Actividad de GPx en citosol y mitocondrias. Los valores expresan \bar{x} + SEM. Diferencias estadísticas con respecto al grupo **WT** se indican con el símbolo **a**: $p < 0.05$ (ANOVA, Test de Tukey).

Actividad de GRd en citosol y mitocondria

En la Fig. 4 se muestra que no existieron diferencias significativas en la actividad de GRd entre los distintos grupos, tanto en citosol como en mitocondrias.

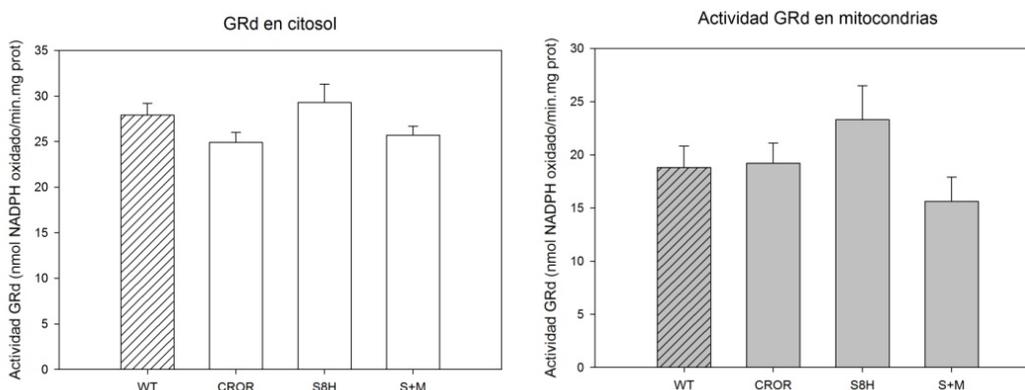


Figura 4. Contenido de GRd en citosol y mitocondrias. Los valores expresan \bar{x} + SEM. No existen diferencias significativas entre los grupos (ANOVA, Test de Tukey).

Discusión.

El ciclo redox del glutatión existe tanto en el citosol como en las mitocondrias de la célula aunque la mitocondria no tiene la capacidad de sintetizar GSH.

Los resultados de este estudio demuestran que tras 8 h de inducida la sepsis, en el citosol hepático ocurre un desbalance oxidativo que se evidenció por la disminución de GSH y el aumento de la relación GSSG/GSH. Este estado no pudo ser contrarrestado por MLT. La actividad de enzimas antioxidantes (GPx y GRd) no varió entre los distintos grupos. La falta de acción de MLT en citosol puede ser atribuido a que los animales carecen de receptores nucleares ROR α para MLT, ya que éstos median la expresión de las enzimas antioxidantes y de la γ -glutamyl-cisteína sintasa, necesaria para la síntesis *de novo* de GSH.

En las mitocondrias se observó una disminución de GSH en el grupo S8H que sí pudo ser contrarrestada por MLT, aunque la relación GSSG/GSH no varió entre los grupos, por lo que tras 8 h de inducida la sepsis, la mitocondria es capaz de mantener su balance redox. La actividad de enzimas antioxidantes no se modificó entre los

diferentes grupos, excepto la GPx en el grupo S+M que presentó un aumento significativo con respecto al grupo WT. Podemos concluir que los efectos producidos por MLT en mitocondrias son independientes de los receptores nucleares ROR α y pueden deberse también a que MLT se acumula en estas organelas.

Referencias.

[1] Bone RB, Grodzin CG, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. Chest. 112:235-43. 1998

[2] Fink T, Glas M, Wolf A, Kleber A, Reus E, Wolff M, Kiefer D, Wolf B, Rensing H, Volk T, Mathes AM. Melatonin Receptors Mediate Improvements of Survival in a Model of Polymicrobial Sepsis. Crit Care Med. 42(1):22-31. 2014.

Agradecimientos. Los autores agradecen al Dr. Angel Catalá y el financiamiento de ANPCyT (PICT 2012-1795, PICT 2010-1779), UNLP (UNLP I163), CONICET (PIP 0157) e Instituto de Salud Carlos III, España (RD12/0043/0005)

-